

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 9/16, 39/39		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/17167 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Juni 1995 (29.06.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH94/00242 (22) Internationales Anmeldedatum: 23. December 1994 (23.12.94)		(81) Bestimmungsstaaten: AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Prioritätsdaten: 3849/93-6 23. December 1993 (23.12.93) CH		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GFF GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER INDUSTRIEORIENTIERTEN FORSCHUNG [CH/CH]; Technopark, Pfingstweidstrasse 30, CH-8005 Zürich (CH).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GANDER, Bruno [CH/CH]; Eichlistrasse 21, CH-6405 Immensee (CH). CORRADIN, Giampietro [IT/CH]; Prazdom Nicod 12, CH-1000 Lausanne 26 (CH). MEN, Ying [CN/CH]; Avenue Victor-Ruffy 52, CH-1012 Lausanne (CH). THOMASIN, Claudio [CH/CH]; Neue Jonastrasse 105, CH-Rapperswil (CH). MERKLE, Hans, Peter [DE/CH]; Ottenbergstrasse 22, CH-8049 Zürich (CH).			

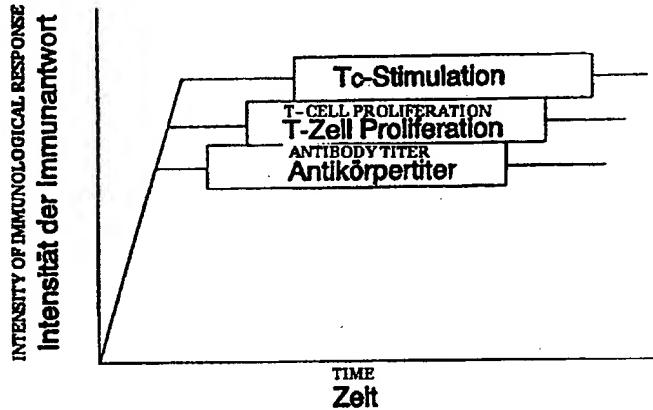
(54) Title: IMMUNOLOGICAL RESPONSE POTENTIATION PROCESS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR POTENZIERUNG DER IMMUNOLOGISCHEN ANTWORT

(57) Abstract

An immunological response potentiation process is disclosed for synthetic or genetically engineered antigens having low immunogenicity. The antigen is embedded into biodegradable microparticles, these antigen-loaded microparticles are dispersed in a biodegradable medium which triggers when it is parenterally administered a potentiated antibody, T_H-lymphocyte and T_c-lymphocyte response, as compared to an aqueous antigen solution. The extent of immunological potentiation is at least comparable with that attained by IFA

compositions. Linear B-T_H-cell epitopes, linear T_c-cell epitopes, dimers and multimers of said epitopes, as well as their mixtures, are used as low immunogenicity antigens. The microparticles are based on biodegradable biopolymers such as polyester, polyanhydride, polyorthoester. By mixing microparticles with different wettabilities, swellabilities, release and biodegradation times, the most intense and longest immunological potentiation is achieved. This process is useful for immunising human beings and animals against diseases caused by viruses, bacteria, protozoa or tumour cells.



(57) Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Immunpotenzierung von schwach immunogenen, synthetisch oder gentechnologisch hergestellten Antigenen beschrieben, welches das Antigen in biologisch abbaubare Mikropartikel einbietet, diese antigenbeladenen Mikropartikel in einem biologisch abbaubaren Medium dispergiert, und nach parenteraler Verabreichung eine gegenüber einer wässrigen Lösung des Antigens potenzierte Antikörper-, TH-Lymphozyten- und Tc-Lymphozyten-Antwort auslöst. Das Ausmass der Immunpotenzierung ist mindestens vergleichbar mit der mittels IFA-Zubereitungen erzielten Potenzierung. Als schwach immunogene Antigene werden lineare B-TH-Zell Epitope, lineare Tc-Zell Epitope, Di- und Multimere dieser Epitope, sowie deren Mischungen eingesetzt. Die Mikropartikel sind aufgebaut auf bioabbaubaren Biopolymeren wie Polyester, Polyanhydride, Polyorthoester, wobei ein Gemisch von Mikropartikeln mit unterschiedlicher Benetzungbarkeit, Quellbarkeit, Freigabe- und Bioabbauzeit die in Intensität und höchste und im zeitlichen Verlauf längste Immunpotenzierung bewirkt. Das Verfahren findet Anwendung in der Immunisierung von Mensch und Tier gegen Krankheiten, die durch Viren, Bakterien, Protozoen oder Tumorzellen verursacht werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Beschreibung:**Verfahren zur Potenzierung der immunologischen Antwort**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Potenzierung der Immunogenität von synthetischen, schwach immunogenen Antigenen. Unter synthetischen, schwach immunogenen Antigenen werden nachfolgend Verbindungen mit Peptid- bzw. Proteinstruktur verstanden, welche entweder chemisch oder mittels rekombinanter DNA-Technologie hergestellt werden und die nach parenteraler Verabreichung in wässriger Lösung oder als Alumini-umadsorbat eine nur unbedeutende immunologische Antwort mit sehr niedrigen Antikörpertitern und fehlender oder nur geringer T-Zell Proliferation auslösen. Nachfolgend soll diese Gruppe von Antigenen der Einfachheit halber als synthetische Antigene bezeichnet werden. Definitionsgemäss ist also die Immunantwort auf die hier beschriebenen synthetischen Antigene vernachlässigbar, wenn diese in wässriger Lösung verabreicht werden. Als experimentelle Referenzzubereitung wird Inkomplettes Freund's Adjuvans (IFA) verwendet. IFA ist eine Wasser in Öl (W/O) Zubereitung, welche bekannterweise sowohl die humorale wie zelluläre Immunantwort stimuliert. Wegen starken unerwünschten Nebeneffekten darf IFA jedoch nur zu Versuchszwecken verwendet werden. Unter dem Begriff Impfstoff werden nachfolgend Formulierungen verstanden, welche zusätzlich zum Antigen Stoffe enthalten, die ihrerseits reine Hilfsstofffunktion oder eine immunpotenzierende Funktion oder gar eine Kombination beider Funktionen ausüben. Reine Hilfsstoffe sind beispielsweise Wasser zur Auflösung des Antigens für die parenterale Verabreichung, antimikrobielle, isotonisierende und pH-stabilisierende Hilfsstoffe. Immunpotenzierende Stoffe werden oft auch als Adjuvantien bezeichnet, worunter beispielsweise unlösliche Aluminiumsalze (-phosphate, -hydroxide), gewisse Lipopolysaccharide, Muramylpep-

tide, Trehalose-Verbindungen, verschiedene Cytokine wie Interleukin 1, lipophile Blockcopolymere (Poloxamere) fallen. Adjuvaneigenschaften besitzen jedoch auch die experimentelle Referenzzubereitung Inkomplettes Freund's Adjuvans und verschiedene noch in der Entwicklung sich befindliche Impfstoff-Darreichungsformen wie Liposomen, Emulsionen, Nanokapseln. Diese Darreichungsformen bewirken nicht nur die Bildung eines Antigendepots *in vivo*, sondern besitzen auch immunstimulierende Eigenschaften.

Die Entwicklung neuer Impfstoffe und die Verbesserung bestehender Impfstoff-Formulierungen hat in den letzten Jahren an Bedeutung und Dringlichkeit gewonnen (E. Eppstein et al., New adjuvants for vaccines containing purified protein antigens, Advances in Drug Delivery Review 4, 233-253, (1990)). Die Herstellung synthetischer Antigene wie auch die Entwicklung geeigneter Adjuvansformulierungen und Darreichungsformen, welche die Immunogenität von schwach immunogenen Verbindungen erhöhen, stehen dabei im Vordergrunde. Die Entwicklung neuer Antigene hat einerseits Krankheiten zum Ziel, gegen die es noch keine oder nur ungenügend wirksame Impfstoffe gibt wie beispielsweise AIDS, Malaria, Tuberkulose, Cholera, Hepatitis A, Krebserkrankungen; andererseits gehen die Bemühungen dahin, die in den traditionellen Impfstoffen enthaltenen Antigene wie inaktivierte Viren, Bakterien oder Toxide, durch einfacher zu produzierende und zu reinigende und besser charakterisierbare niedermolekulare Peptide und Proteine zu ersetzen, welche die antigenen Bereiche der eigentlichen Infektionserreger in ihrer Struktur aufweisen. Solche antigenen Peptide und Proteine können biochemisch oder durch rekombinante DNA-Technologie in hoher Reinheit gewonnen werden. Diese neue Generation von synthetischen Antigenen besitzen in ihrer chemischen Struktur Peptidsequenzen (Epitope), welche antigen-spezifische T_h - (Helfer), T_c - (cytotoxisch) und B-Lymphozyten stimulieren. Dabei können die sogenannten T_h -, T_c - und B-Zell-Epitope je einzeln vorliegen oder kovalent zu einem chimeren B-T-Epitop verknüpft werden. Da diese gentechnologisch

oder chemisch hergestellten Antigene im allgemeinen niedrige Molekulargewichte von zirka 500 - 2'000 aufweisen, ist ihre Immunogenität im Gegensatz zu Toxoiden mit Molekulargewichten von 50'000 bis 150'000 oder im Gegensatz zu partikulären Antigenen wie inaktivierten Viren und anderen Mikroorganismen sehr schwach.

Bisher bekannte Strategien zur Immunogenitätspotenzierung von synthetischen Antigenen beruhen darauf, in einem ersten Schritt das Molekulargewicht dieser Antigene durch kovalente Verknüpfungen zu erhöhen, und in einem zweiten Schritt diese höher molekularen Konstrukte in immunpotenzierende Formulierungen einzubringen.

Es ist bekannt, dass die Erhöhung des Molekulargewichtes dadurch erreicht werden kann, dass das synthetische Antigen kovalent an hochmolekulare Trägerproteine wie beispielsweise Diphtherie- und Tetanus-Toxoid, Rinderserumalbumin, Napfschnecken-Haemocyanin gebunden wird. Nachteilig an den Antigen-Trägerprotein-Konstrukten sind der Einsatz von sehr teuren und relativ unreinen Trägerproteinen aus Fremdorganismen, die Notwendigkeit von reaktiven und relativ toxischen Agenzien zur kovalenten Verknüpfung von Antigen und Trägerprotein, und die Schwierigkeit der Reinigung, sowie der Identitäts- und Reinheitsprüfung dieser Verbindungen. Es wurde andererseits auch vorgeschlagen, das Molekulargewicht von B-T-Epitopen dadurch zu erhöhen, dass diese selbst in einer Art Aststruktur kovalent zu Multimeren verknüpft werden (J.P. Tam, Y.-A. Lu, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 86, 9084-9088 (1989)). Diese Konstrukte werden als Multiple Antigen Peptide, kurz MAP, bezeichnet.

Weiterhin ist bekannt, dass die Kombination eines B- und T_H-Epitops essentiell ist für das Zustandekommen einer Antikörperbildung und dass die Kombination eines T_c-Epitops mit einem T_H-Epitop die cytotoxische Lymphozyten-Antwort, auch CTL-Antwort genannt, nach Verabreichung in IFA verbessern kann (C. Widmann et al., J. Immunol. Methods 155, 95-99 (1992)).

Nach der PS-EP-A1-513'861 werden verschiedene immunpoten-

zierende Formulierungen für solche schwach immunogenen Antigene und deren höhermolekularen Konstrukte beschrieben. Dazu gehören in erster Linie Immunstimulantien enthaltende O/W-Emulsionen. Nachteilig an diesen grobdispersen bzw. kolloiddispersen Systemen sind ihre inherente thermodynamische Instabilität, die sich bei Lagerung in Koaleszenzerscheinungen widerspiegeln kann. Weiterhin unterliegen die Komponenten solcher flüssig-dispersen Formulierungen chemischen Veränderungen wie Oxydation und Hydrolyse. Zudem benötigen die beschriebenen Formulierungen meist Immunstimulantien wie Muramylpeptide, die toxikologisch nicht ganz unbedenklich sind. Schliesslich zeigen diese Formulierungen keinerlei Langzeiteffekt. Um einen Impfschutz über mehrere Jahre zu erzielen ist es deshalb notwendig diese Impfstoff-Formulierungen nach einem festgelegten Impfplan drei bis viermal zu injizieren (sogenannte "Booster"-Injektionen).

Im weiteren ist nach der int. Veröffentlichungsschrift W092/19263-A1 ein System zur Immunpotenzierung von Antigenen bekannt, welches sogenannte biodegradierbare Mikrosphären, auch Mikrokapseln oder Mikropartikel genannt, verwendet. Nachteilig an diesem Verfahren ist, dass die Immunpotenzierung hauptsächlich in der gastrointestinalen Mukosa beobachtet wird und deshalb nur für relativ wenige Krankheitserreger (sog. enteropathogene Mikroorganismen) Wirkung zeigen dürfte. Die Tatsache, dass die Mikropartikel zudem in den Zwölffingerdarm verabreicht werden und nicht peroral eingegeben oder eingenommen werden können, schliesst eine praktische Anwendung, zumindest beim Menschen, aus. Ausserdem scheint nach PS-EP-A2-333'523 ein ausgewogenes Mass an feinen (1 - 10 μm) und grobkörnigeren (20 - 50 μm) Mikropartikel eine wichtige Voraussetzung für den immunpotenzierenden Effekt zu sein. Diese Anforderungen an den Korngrößenbereich der Mikropartikel stellen einen Mehraufwand bei der Herstellung und Aufarbeitung der Mikropartikel dar, was nachteilig erscheint.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein synthetisches Antigen mittels spezifischer Biopolymere in bioabbaubare Mikropartikel einzubetten, diese Mikropartikel in einem Dispersionsmedium zu suspendieren und parenteral zu verabreichen, wobei eine Potenzierung der systemischen immunologischen Antwort bewirkt wird.

Erfindungsgemäss wird diese Aufgabe mit einem Verfahren gemäss dem Wortlaut der Patentansprüche 1-12 gelöst. In den Beispielen 1 - 6 werden Ausführungsbeispiele dazu beschrieben. Das erfundungsgemäss Verfahren wird nachfolgend an Hand der Fig. 1 - 7 näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 Schematische Darstellung des erfundungsgemässen Immunpotenzierung

Fig. 2 Antikörpertiter nach einmaliger Verabreichung von MAP enthaltenden, schnell freigebenden Mikrokapseln und einer IFA-Formulierung

Fig. 3 Antikörpertiter nach einmaliger Verabreichung von MAP enthaltenden, langsam freigebenden Mikrokapseln und einer IFA-Formulierung

Fig. 4 Antikörpertiter nach einmaliger Verabreichung einer MAP enthaltenden Mischung von schnell und langsam freigebenden Mikrokapseln und einer IFA-Formulierung

Fig. 5 Antikörpertiter nach dreimaliger Verabreichung von MAP enthaltenden, schnell freigebenden Mikrokapseln und einer IFA-Formulierung

Fig. 6 Proliferative T-Lymphozyten-Antwort nach einmaliger Verabreichung verschiedenen MAP enthaltenden Mikrokapseln und einer IFA-Formulierung

Fig. 7 T_c -Antwort nach einmaliger Verabreichung einer Mischung schnell freigebender Mikrokapseln, die jeweils ein synthetisches T_c -Antigen und ein entsprechendes MAP enthalten

1. Einbetten von synthetischem Antigen in bioabbaubare Mikropartikel

Ausgangspunkt des Verfahrens sind synthetische Antigene gemäss Definition in der Einleitung dieser Patentschrift, die in ihrer bekannten chemischen Struktur mindestens ein definiertes und vom Immunsystem erkennbares Epitop eines pathogenen Mikroorganismus enthalten. Dabei kann es sich beim Epitop sowohl um ein B-Zell-Epitop, ein T_h -Zell-Epitop, ein T_c -Epitop oder eine beliebige Mischung dieser Epitope handeln. Bevorzugterweise bilden die sogenannten Multiplen Antigen Peptide (MAP), alleine oder in Kombination mit einem T_c -Epitop, den Ausgangspunkt des Verfahrens. Die Herkunft der Epitope schliesst Bakterien, Viren, Protozoen und Tumorzellen ein. Erfindungsgemäss wird das synthetische Antigen in bioabbaubare Mikropartikel eingebettet. Erfindungswesentlich ist, dass zur Herstellung der bioabbaubaren Mikropartikel Biopolymere mit spezifischen physikalisch-chemischen Eigenschaften ausgewählt werden. Massgebliche Eigenschaften sind die Benetzbarkeit, die Unlöslichkeit, die Quellbarkeit und die Bioabbaubarkeit der Biopolymere und der daraus hergestellten sphärischen Mikropartikel in wässrigen Medien und physiologischen Flüssigkeiten. Das Ausmass der Quellbarkeit der Biopolymere sowie deren Bioabbaazeit bestimmen massgeblich die Freisetzungskinetik der Antigene aus den Mikrokapseln. Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass diese Freigabekinetik auch den zeitlichen Verlauf der Immunantwort beeinflusst. Beispiele solcher Biopolymere mit unterschiedlicher Benetzbarkeit, Quellbarkeit und Bioabbaazeit sind Poly(milchsäure), Poly(milch-co-glykolsäure), Poly(hydroxybuttersäure), Poly(hydroxybutter-co-valeriansäure), Poly(caprolacton). Die Einbettung des synthetischen Antigens in die Biopolymere ist so zu gestalten, dass es nach einer einmaligen Verabreichung der Mischung schnell freigesetzt wird.

schen Antigens in das Biopolymer erfolgt mittels verschiedener bekannter Verfahren wie Sprühtrocknung, Lösungsmittel-Verdampfung oder Koazervation. Dabei resultieren antigenbeladene, sphärische Mikropartikel in der Größenordnung von 1 bis 200 μm .

2. Suspendieren im Dispersionsmedium

Die erfindungsgemäßen antigenbeladenen Mikropartikel werden in einem zweiten Schritt in ein Dispersionsmedium eingebracht, das für die parenterale Verabreichung der Mikropartikel geeignet ist. Erfindungswesentlich ist dabei, dass das Dispersionsmedium biokompatibel und bioabbaubar ist, und zusätzlich für die Potenzierung der Immunantwort vorteilhafte Eigenschaften besitzt. Solche vorteilhaften Dispersionsmedien sind beispielsweise wässrige und ölige Lösungen von Lecithin oder wässrig-ölige Emulsionen mit Lecithin in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 20 %, bevorzugterweise von 2 - 10 %. Weitere geeignete Dispersionsmedien sind sogenannte Mikroemulsionen, die aus einer Wasser-, Öl-, Tensid- und Kotensid-Komponente bestehen. Hierzu werden biokompatible und bioabbaubare Substanzen wie beispielsweise natürliche und synthetische Mono-, Di- und Triglyceride, Lecithin, Poloxamere und Polysorbate verwendet. Die genannten Dispersionsmedien zeichnen sich durch überraschend gute Benetzungs- und Suspendiereigenschaften für die bioabbaubaren Mikropartikel aus. Diese Benetzungs- und Suspendiereigenschaften sind beispielsweise wesentlich besser als jene der üblicherweise verwendeten Dispersionsmedien, wie Carboxymethylcellulose oder Polysorbat. Die Dispergierung der Mikropartikel im Dispersionsmedium kann durch einfaches Schütteln erfolgen, wobei eine injizierbare Zubereitung entsteht.

3. Verabreichen

Die antigenbeladenen und im Dispersionsmedium suspendierten Mikropartikel werden parenteral verabreicht, wobei diese Verab-

reichung einmalig oder mehrmalig in bestimmten Zeitabständen erfolgen kann. Letztere Verabreichungsart ist unter dem Begriff 'Boosten' bekannt. Die 1. und 2. Booster-Dosis kann beispielsweise 1 - 4 Wochen und 3 - 6 Monate nach der ersten Injektion verabreicht werden. Nach einmaliger oder mehrmaliger Verabreichung der erfindungsgemäßen Formulierungen wird eine potenzierte, mehrere Monate anhaltende Immunantwort ausgelöst.

4. Bewirken der potenzierten Immunantwort

Die Potenzierung der Immunantwort wird im allgemeinen nach einmaliger, ausnahmsweise jedoch auch nach dreimaliger parenteraler Verabreichung der erfindungsgemäßen mit synthetischen Antigenen beladenen Mikropartikel in BALB/c Mäusen gemessen. Als synthetische Modell-Antigene wird ein MAP, aufgebaut aus einem universellen T_H-Epitop des Tetanus Toxins (Sequenz 947-967) und einem B-Zell Epitop der repetitiven Region des Circumsporozoit Proteins von Plasmodium berghei, und ein T_c-Epitop von Plasmodium berghei Circumsporozoit-Protein (Sequenz 252-260) verwendet (S. Demotz et al., J. of Immunology, 142, 394-402 (1989); P. Romero et al., Nature 341, 323 (1989); J.L. Weber et al., Exp. Parasitology 63, 295 (1987)). Die Intensität und die Dauer der Immunpotenzierung wird anhand der spezifischen Antikörpertiter, der T-Lymphozyten-Proliferation und der spezifischen, cytotoxischen T-Lymphozyten-Aktivität gemessen. Diese drei Parameter werden nach bekannten immunologischen Methoden bestimmt.

Fig. 1 illustriert schematisch die relevanten Parameter der durch das erfindungsgemäße Verfahren erzielten Immunpotenzierung. Eine Immunpotenzierung bedeutet in der vorliegenden Patentschrift, dass die Intensität der immunologischen Antwort im zeitlichen Verlauf auf ein verabreichtes synthetisches Antigen auf den Ebenen des Antikörpertiters, der T-Zell-Proliferation und der T_c-Stimulation gegenüber einer wässrigen Antigenlösung potenziert und gegenüber einer IFA-Formulierung in vergleichbarem oder erhöhtem Masse potenziert ist.

Daraus ergibt sich die Möglichkeit durch Mischung von Biopolymeren mit unterschiedlicher Benetzbarkeit, Quellbarkeit und Bioabbauzeit sowohl die humorale Antikörper-Antwort wie auch die zelluläre T-Lymphozyten Antwort in einem Masse zu potenzieren, das vergleichbar oder sogar höher ist als die mit Inkomplettem Freund's Adjuvans erzielte Potenzierung. Zudem sind die Immunantworten gemäss diesem Verfahren zeitlich steuerbar und gegenüber IFA und wässriger Lösung um mehrere Wochen verlängert.

Das hier beschriebene Verfahren ermöglicht aufgrund der massgeschneiderten Eigenschaften der verwendeten bioabbaubaren Mikropartikel eine gezielte und in ihrem zeitlichen Verlauf steuerbare Potenzierung der humoralen und zellulären Immunantwort auf synthetische Antigene, insbesondere auf die sogenannten MAP. Das Verfahren besitzt überdies den ausserordentlichen Vorteil, dass nebst der gezielten und potenzierten Stimulation von B- und T_h -Lymphozyten auch cytotoxische T-Lymphozyten stimuliert werden können, wodurch insbesondere auch eine Immunisierung gegen Viren, Protozoen und Tumorzellen erfolgreich durchgeführt werden kann. Diese cytotoxische T-Lymphozyten Stimulation konnte hier überraschenderweise zum ersten Mal gezeigt werden. Im Gegensatz zu den in der PS EP-A2-333'523 und PCT WO 92/19263 beschriebenen Immunpotenzierung ist diese hier in erster Linie systemisch, d.h. nicht mukosal, und kann sowohl in der Intensität wie der Dauer, bzw. im zeitlichen Verlauf, gesteuert werden. Zudem ist für die Immunpotenzierung keine enge, genau definierte Partikelgrößenverteilung notwendig, was technologische Vorteile mit sich bringt.

Das hier beschriebene Verfahren findet Anwendung bei der Immunisierung von Mensch und Tier gegen Krankheiten, die durch Bakterien, Viren, Protozoen und Tumorzellen verursacht werden. Besonders die Immunisierung gegen Viren, Protozoen und Tumorzellen, die mit herkömmlichen Impfstoffen nur unbefriedigend, d.h. ungenügend und unter Inkaufnahme von unerwünschten Nebenwirkungen, erreicht werden kann, stellt eine Hauptanwendung dieses

Verfahrens dar. Die Stimulierung der cytotoxischen T-Zellen durch das erfindungsgemäße Verfahren sowie die über eine längere Zeitperiode anhaltende Immunantwort bilden die Basis für diese Anwendung.

Beispiel 1 beschreibt die Potenzierung der Antikörperantwort auf das verzweigte Multiple Antigen Peptid mit der Bezeichnung P30B2, welches aus einem universellen T_H-Zell Epitop des Tetanus Toxins (Sequenz 947-967) und einem B-Zell Epitop der repetitiven Region des Circumsporozoiten Proteins von Plasmodium berghei aufgebaut ist: 0,02 g P30B2 wurden in 2,00 g Wasser gelöst und diese Lösung wurde anschliessend mit Hilfe eines Ultraschallgenerators in einer Lösung von 2,0 g Poly(d,L-milchsäure-co-glykolsäure) 50:50 (Resomer 502, Boehringer Ingelheim) in 40,0 g Dichlormethan dispergiert. Mittels Sprühtrocknung wurden aus dieser Dispersion sphärische Mikropartikel (RG502) hergestellt. Mit Antigen beladene Mikropartikel wurden anschliessend in einer 5% sterilen Lösung von Eilecithin (Ovothrin 170, Lukas Meyer, D-Hamburg) durch Schütteln suspendiert. Diese Suspension wurde einer Gruppe von 8 BALB/c Mäusen zu je 0,5 ml subcutan injiziert. Die pro Maus injizierte Menge Antigen betrug 30 µg. Als Vergleich wurde eine zweite Gruppe von 8 BALB/c Mäusen mit der gleichen Menge Antigen in Inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) immunisiert. Die Antikörpertiter wurden mittels ELISA bestimmt.

Fig. 2 zeigt den zum Beispiel 1 gehörenden zeitlichen Verlauf der Immunpotenzierung durch RG502 im Vergleich zu IFA. Die mit RG502 und IFA erzielten Antikörpertiter sind während der ersten 15 Wochen nach Immunisierung untereinander vergleichbar. Danach fallen die durch IFA induzierten Titer ab, während die mit den Mikrokapseln induzierten Titer während mindestens 28 Wochen konstant bleiben. Mit einem hydrophilen, stark quellbaren, schnell freigebenden und schnell bioabbaubaren Biopolymeren wie dem PLGA 50:50 werden Antikörpertiter von $1 - 2 \cdot 10^3$ bereits zwei Wochen nach Verabreichung erreicht und bleiben über eine Zeitspanne von mindestens 28 Wochen konstant. Im Gegensatz dazu

fallen die nach einmaliger Verabreichung einer IFA-Zubereitung gemessenen Titer bereits nach 15 Wochen ab und liegen nach 28 Wochen nur noch bei $2 \cdot 10^2$.

Beispiel 2 beschreibt die Potenzierung der Antikörperantwort auf das verzweigte Multiple Antigen Peptid mit der Bezeichnung P30B2 (gemäss Beispiel 1), welches aus einem universellen T_H-Zell Epitop des Tetanus Toxins (Sequenz 947-967) und einem B-Zell Epitop der repetitiven Region des Circumsporozoiten Proteins von Plasmodium berghei aufgebaut ist: 0,02 g P30B2 wurden in 2,00 g Wasser gelöst und diese Lösung wurde anschliessend mit Hilfe eines Ultraschallgenerators in einer Lösung von 2,0 g Poly(d,L-milchsäure) (Resomer 206, Boehringer Ingelheim) in 40,0 g Dichlormethan dispergiert. Mittels Koazervation, induziert durch Silikonölzugabe, wurden aus dieser Dispersion sphärische Mikropartikel (R206) hergestellt. Mit Antigen beladene Mikropartikel wurden anschliessend in einer 5% sterilen Lösung von Eilecithin (Ovothin 170, Lukas Meyer, D-Hamburg) durch Schütteln suspenziert. Diese Suspension wurde einer Gruppe von 8 BALB/c Mäusen zu je 0,5 ml subcutan injiziert. Die pro Maus injizierte Menge Antigen betrug 30 µg. Als Vergleich wurde eine zweite Gruppe von 8 BALB/c Mäusen mit der gleichen Menge Antigen in Inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) immunisiert. Die Antikörpertiter wurden mittels ELISA bestimmt.

Fig. 3 zeigt den zum Beispiel 2 gehörenden zeitlichen Verlauf der Immunpotenzierung durch R206 im Vergleich zu IFA. Die mit dem hydrophoben, schwach quellbaren, langsam freigebenden und langsam bioabbaubaren R206 erzielten Antikörpertiter steigen während der ersten 12 Wochen kontinuierlich an und erreichen dann das Niveau, das mit IFA bereits 2 Wochen nach Immunisierung erzielt wurde. Während die IFA-Titer nach ungefähr 15 Wochen wieder stetig abfallen, bleiben die R206-Titer über einen Zeitraum von mindestens 28 Wochen konstant.

Beispiel 3 beschreibt die Potenzierung der Antikörperantwort

auf das verzweigte Multiple Antigen Peptid mit der Bezeichnung P30B2 (gemäß Beispiel 1), welches aus einem universellen T_H-Zell Epitop des Tetanus Toxins (Sequenz 947-967) und einem B-Zell Epitop der repetitiven Region des Circumsporozoiten Proteins von Plasmodium berghei aufgebaut ist: P30B2 wurde analog Beispiel 1 in Poly(d,l-milchsäure-co-glykolsäure) 75:25 (Resomer RG752, Boehringer Ingelheim) eingebaut und zu sphärischen Mikropartikeln (RG752) verarbeitet. Identische Mengen P30B2 enthaltende Mikropartikel RG752, RG502 (aus Beispiel 1) und R206 (aus Beispiel 2) wurden in einer 5% sterilen Lösung von Eilecithin (Ovothin 170, Lukas Meyer, D-Hamburg) durch Schütteln suspendiert. Diese Suspension wurde einer Gruppe von 8 BALB/c Mäusen zu je 0,5 ml subcutan injiziert. Die pro Maus injizierte Menge Antigen betrug 30 µg. Als Vergleich wurde eine zweite Gruppe von 8 BALB/c Mäusen mit der gleichen Menge Antigen in Inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) immunisiert. Die Antikörpertiter wurden mittels ELISA bestimmt.

Fig. 4 zeigt den zum Beispiel 3 gehörenden zeitlichen Verlauf der Immunpotenzierung durch eine Mischung von RG502, RG752 und R206 im Vergleich zu IFA. Die mit dieser aus schnell und langsam freigebenden Biopolymeren bestehenden Mikrokapselmischung erzielten Antikörpertiter steigen schnell an und erzielen bereits 2 Wochen nach Immunisierung ein Niveau, das um einen Faktor 2,5 höher liegt als die mit IFA induzierten Antikörpertiter. Während die IFA-Titer nach ungefähr 15 Wochen wieder stetig abfallen, bleiben die mit der Mikrokapselmischung erzielten Titer über einen Zeitraum von mindestens 28 Wochen relativ konstant.

Beispiel 4 beschreibt die Potenzierung der Antikörperantwort auf das verzweigte Multiple Antigen Peptid mit der Bezeichnung P30B2 (gemäß Beispiel 1), welches aus einem universellen T_H-Zell Epitop des Tetanus Toxins (Sequenz 947-967) und einem B-Zell Epitop der repetitiven Region des Circumsporozoiten Proteins von Plasmodium berghei aufgebaut ist: P30B2 wurde analog Beispiel 1 in Poly(d,l-milchsäure-co-glykolsäure) 50:50 (Resomer RG502,

Boehringer Ingelheim) eingebaut und zu sphärischen Mikropartikeln (RG502) verarbeitet. Die mit Antigen beladenen Mikropartikel wurden in einer 5% sterilen Lösung von Eilecithin (Ovothin 170, Lukas Meyer, D-Hamburg) durch Schütteln suspendiert. Diese Suspension wurde einer Gruppe von 8 BALB/c Mäusen zu je 0,5 ml subcutan injiziert. Die pro Maus injizierte Menge Antigen betrug 3x10 µg. Die Injektion wurde nach 16 Tagen (1. Booster) und nach 113 Tagen (2. Booster) wiederholt. Als Vergleich wurde eine zweite Gruppe von 8 BALB/c Mäusen mit der gleichen Menge Antigen in Inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) und nach dem gleichen Impfschema immunisiert. Die Antikörpertiter wurden mittels ELISA bestimmt.

Fig. 5 zeigt den zum Beispiel 4 gehörenden zeitlichen Verlauf der Immunpotenzierung nach Booster Injektionen von RG502 im Vergleich zu IFA. Die mit RG502 und IFA erzielten Antikörpertiter steigen gleichermaßen an. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich demzufolge auch für die durch Boosten erzielte Immunpotenzierung.

Beispiel 5 beschreibt die Potenzierung der T_H-Lymphozyten-Proliferation auf das Multiple Antigen Peptid mit der Bezeichnung P30B2 gemäss Beispielen 1-4. P30B2 wurde analog Beispielen 1,2 und 3 in RG502, RG752, und R206 eingebaut und zu sphärischen Mikropartikeln mit unterschiedlich starker Quellbarkeit verarbeitet. Identische Mengen P30B2 enthaltende Mikropartikel wurden in einer 5% sterilen Lösung von Eilecithin (Ovothin 170, Lukas Meyer, D-Hamburg) durch Schütteln suspendiert. Diese Suspension wurde einer Gruppe von 8 BALB/c Mäusen zu je 0,5 ml subcutan injiziert. Die pro Maus injizierte Menge Antigen betrug 30 µg. Als Vergleich wurde eine zweite Gruppe von 8 BALB/c Mäusen mit der gleichen Menge Antigen in Inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) immunisiert. Die T-Zell-Proliferation in den Lymphknoten wurde in bekannter Weise bestimmt.

Fig. 6 zeigt die in Beispiel 5 beschriebene T-Lymphozyten-Proliferation 14 Tage nach Verabreichung verschiedener Mikrokapselformulierungen sowie einer IFA-Zubereitung. Es geht daraus

hervor, dass alle Mikrokapselformulierungen, d.h. RG502 mit schneller Antigenfreigabe, RG752 mit mittelstark verlangsamter, und R206 mit stark verlangsamter Antigenfreigabe, sowie eine Mischung aller drei Mikrokapseltypen die T-Lymphozyten-Proliferation in einem mindestens vergleichbaren, z.T. stärkeren Masse potenziert als eine IFA-Zubereitung.

Beispiel 6 beschreibt das Auslösen einer cytotoxischen T-Lymphozyten-Reaktion auf ein T_c-Zell Epitop des Circumsporozoit Proteins von *Plasmodium berghei* (CTL 359A, Sequenz 252-260): 0,008 g CTL 359A wurden in 1,0 g Wasser gelöst und diese Lösung wurde anschliessend mit Hilfe eines Ultraschallgenerators in einer Lösung von 4,0 g Poly(d,l-milchsäure-co-glykolsäure) (Resomer 502, Boehringer Ingelheim) in 60,0 g Dichlormethan dispergiert. Mittels Sprühtrocknung wurde aus dieser Dispersion sphärische Mikropartikel hergestellt. Diese mit CTL 359A beladenen Mikropartikel wurden mit P30B2 beladenen Mikropartikeln, gemäss Beispiel 1, in einem CTL 359A : P30B2 Verhältnis von 1 : 10 gemischt, um die Immunantwort auf CTL zu erhöhen. Anschliessend wurde die Mischung der Mikrokapseln in einer 5% sterilen Lösung von Eilecithin (Ovothin 170, Lukas Meyer, D-Hamburg) durch Schütteln suspendiert. Diese Suspension wurde einer Gruppe von 2 BALB/c Mäusen zu je 0,5 ml subcutan injiziert. Die pro Maus injizierten Mengen betrugen: 4 µg CTL 359A und 40 µg P30B2. Die T_c-Zell Antwort wurde nach 10 und nach 20 Tagen mittels Zell-Lyse-Test bestimmt.

Fig. 7 zeigt die zum Beispiel 6 gehörende T_c-Lymphozyten-Antwort, die 10 und 20 Tage nach Immunisierung, bzw. nach der Verabreichung der Formulierungen, bestimmt wurde. Die prozentuale Zell-Lyse-Aktivität ist in Abhängigkeit des Effekt/Zielzellen-Verhältnisses E/T dargestellt. Die gleichzeitige Verabreichung von mikroverkapseltem T_c-Epitop und T_h-Epitop (P30B2 + 359A in RG502) induziert überraschenderweise eine signifikante T_c-Lymphozyten-Stimulation, die 20 Tage nach Verabreichung beobachtet werden kann. Besonders interessant erscheint der zeitliche

Verlauf der T_c -Antwort, die im Gegensatz zur T_h - oder Antikörper-antwort bedeutend längere Zeit benötigt.

Erfindungswesentlich ist, dass bioabbaubare sphärische Mikropartikel vorgeschlagen werden, welche die Immunantwort auf synthetische Antigene potenzieren. Durch Festlegen der physikalisch-chemischen Eigenschaften der verwendeten Biopolymere lässt sich diese Immunpotenzierung in ihrem Ausmass und zeitlichen Verlauf steuern. Das Verfahren ermöglicht es zudem, zusätzlich zur Antikörper- und T_h -Lymphozyten-Potenzierung auch die cytotoxischen T-Lymphozyten zu stimulieren. Das Ausmass der Immunpotenzierung ist mindestens vergleichbar mit der durch IFA-Zubereitungen erzielten Potenzierung und in ihrem zeitlichen Verlauf deutlich verlängert. Hiermit steht ein Verfahren zur Verfügung, welches in der Immunisierung von Mensch und Tier gegen Krankheiten eingesetzt werden kann, welche durch Viren, Bakterien, Protozoen oder Tumorzellen verursacht werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Potenzierung der immunologischen Antwort von Mensch und Tier auf synthetische Antigene, dadurch gekennzeichnet, dass das synthetische Antigen zunächst in bioabbaubare sphärische Mikropartikel eingebettet wird, dass danach die mit synthetischem Antigen beladenen Mikropartikel in einem Dispersionsmedium suspendiert werden und dass diese Zubereitung parenteral verabreicht wird, wobei eine potenzierte Immunantwort ausgelöst wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als synthetisches Antigen eine Verbindung verwendet wird, die aus einer einfachen Kette mit mindestens einem B-Zell-Epitop und mindestens einem T_H -Zell-Epitop besteht.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als synthetisches Antigen eine Verbindung verwendet wird, die aus repetitiv kovalent verknüpften B-Zell-Epitopen und T_H -Zell-Epitopen bestehen.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als synthetisches Antigen eine Verbindung verwendet wird, die aus einem cytotoxischen T-Zell-Epitop (T_c) besteht.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als synthetisches Antigen eine Mischung mindestens eines T_H - und mindestens eines T_c -Epitops verwendet wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das synthetische Antigen von Protozoen oder Viren oder Bakterien oder Tumorzellen stammende B- und T-Zell-Epitope enthält.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das synthetische Antigen von Protozoen oder Viren oder Bakterien oder Tumorzellen, oder von einer beliebigen Kombination derselben stammende B- und T-Zell-Epitope enthält.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die sphärischen Mikropartikel aus einem biokompatiblen bioabbaubaren Biopolymeren aufgebaut sind, wobei das Biopolymer aus der Gruppe der Poly(milchsäure), Poly(glykolsäure), Poly(milch-co-glykolsäure), Polycaprolacton, Poly(hydroxybuttersäure), Poly(hydroxybuttersäure-co-valeriansäure), Polyorthoester oder der Polyanhydride stammt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Biopolymere aus mindestens zwei verschiedenen Gruppen stammen.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Dispersionsmedium eine wässrige oder ölige Lecithin-Lösung oder eine wässrig-ölige Lecithin-Emulsion verwendet wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Dispersionsmedium eine Mikroemulsion verwendet wird.

12. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 11 in der Immunisierung von Mensch und Tier gegen Krankheiten, die durch Viren, Bakterien, Protozoen oder Tumorzellen verursacht werden.

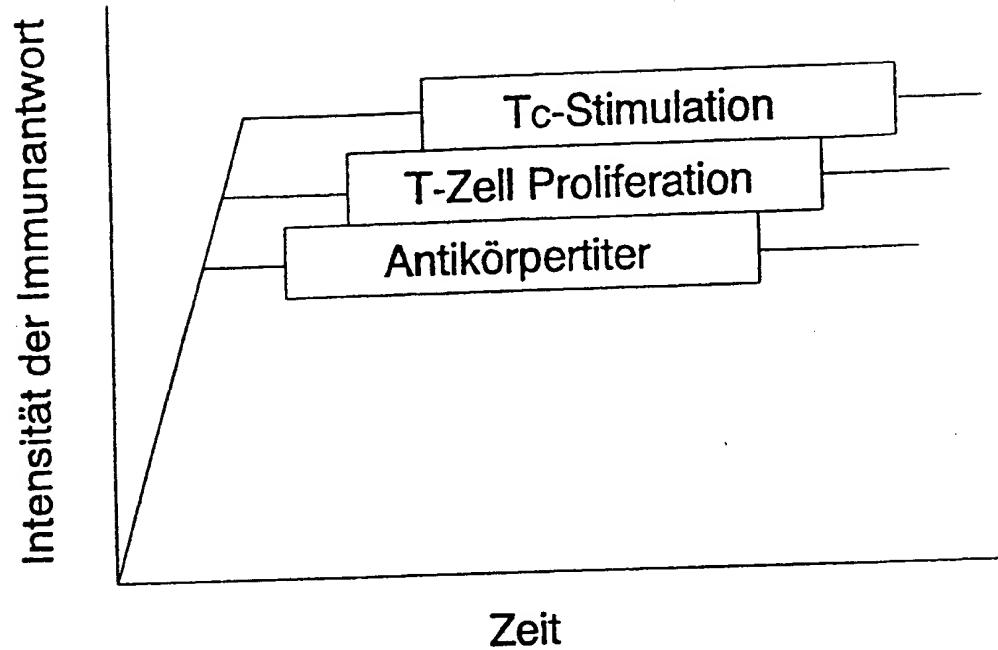


Fig. 1

Anti-P30B2 Antikörpertiter

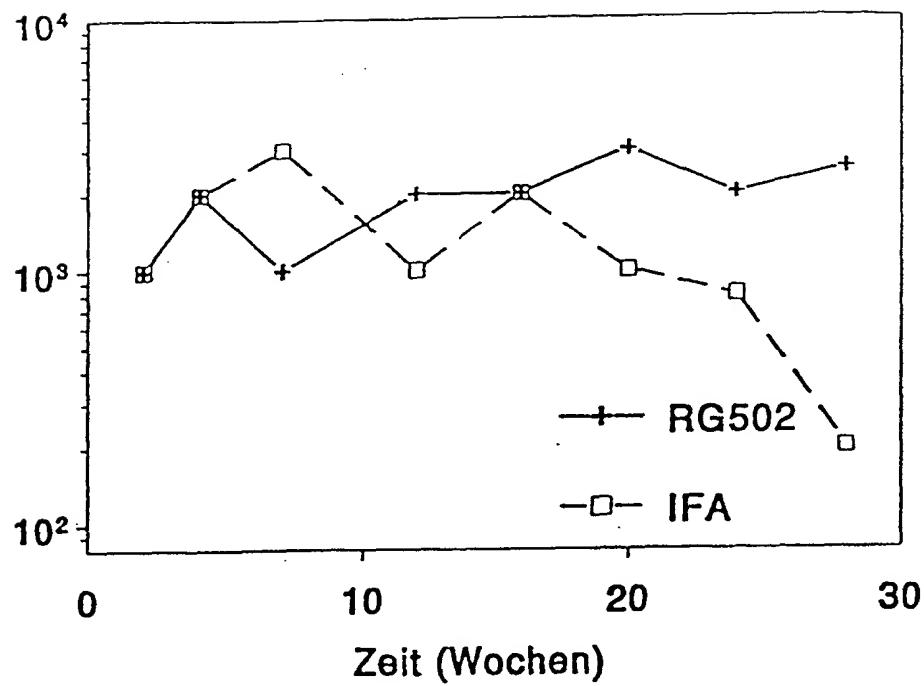


Fig. 2

Anti-P30B2 Antikörpertiter

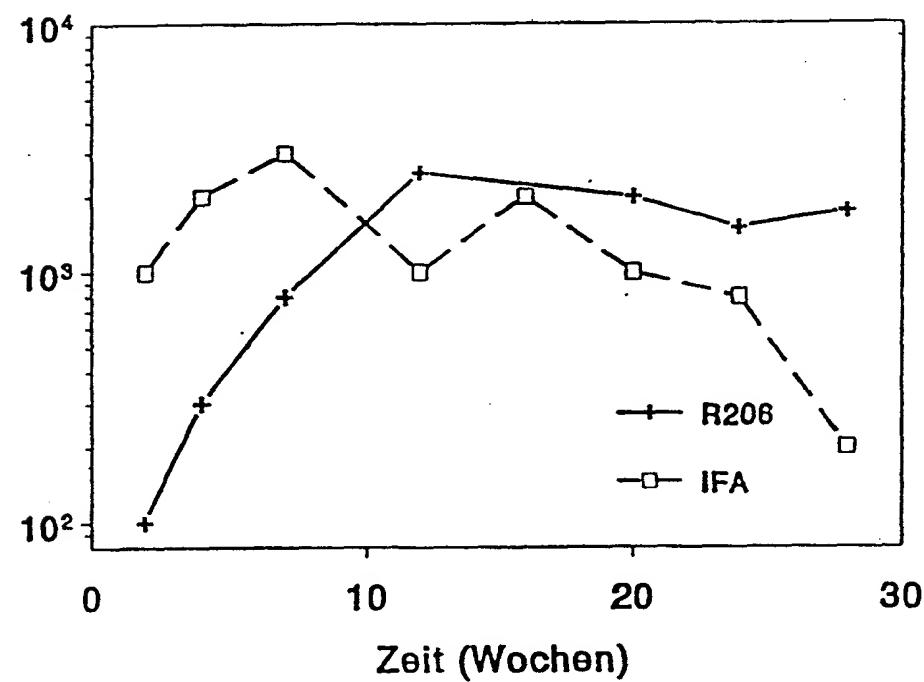


Fig. 3

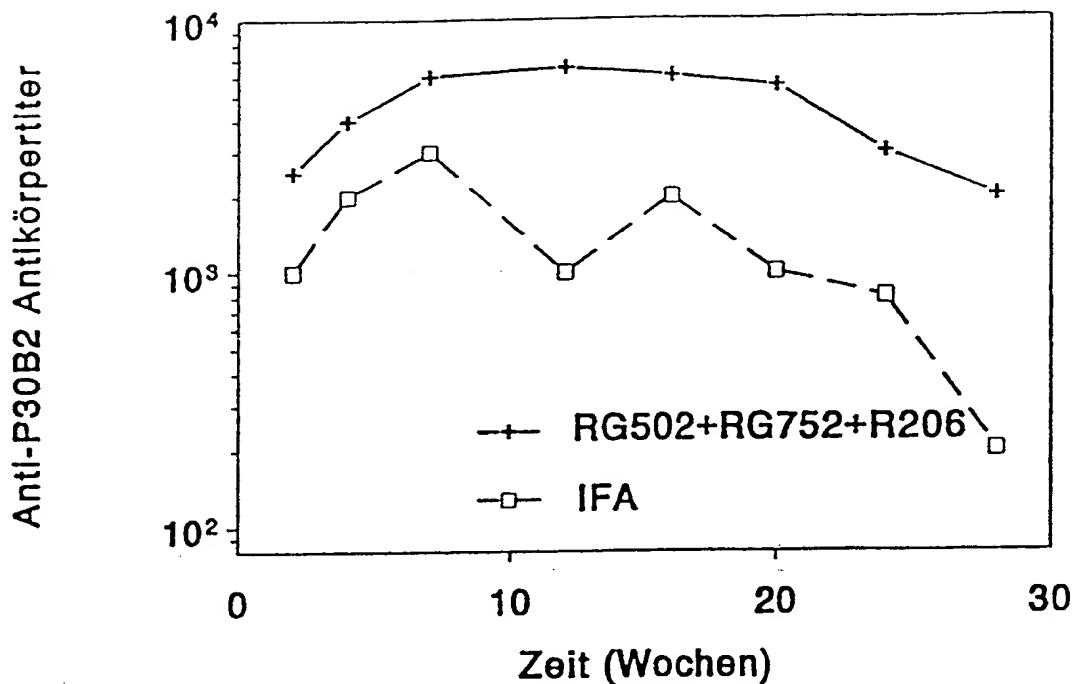


Fig. 4

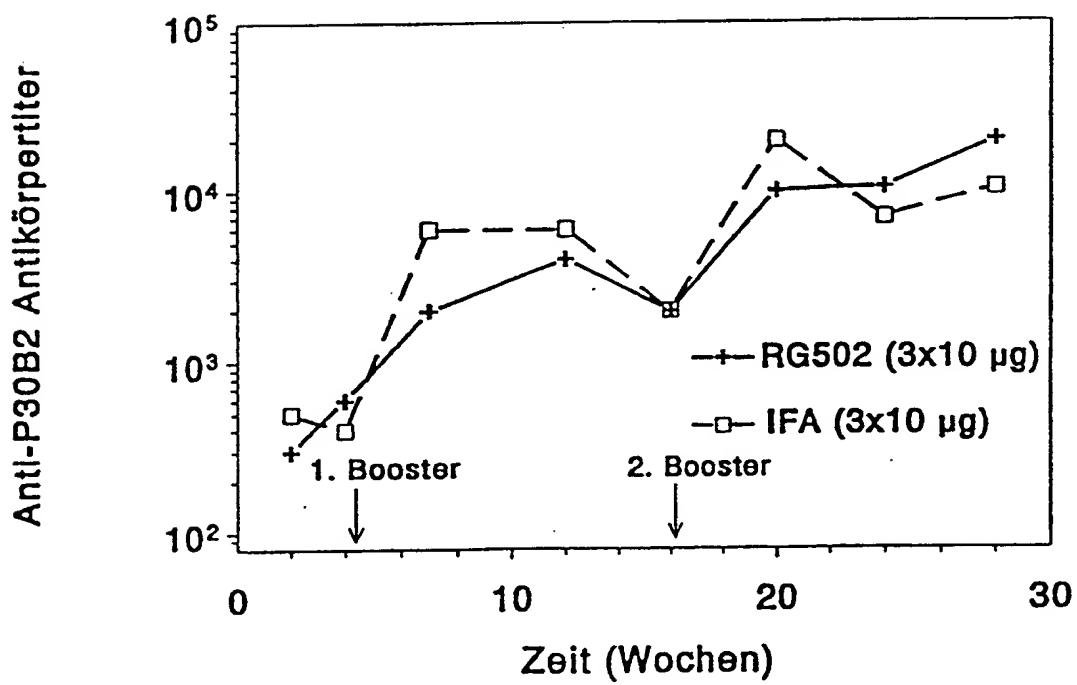


Fig. 5

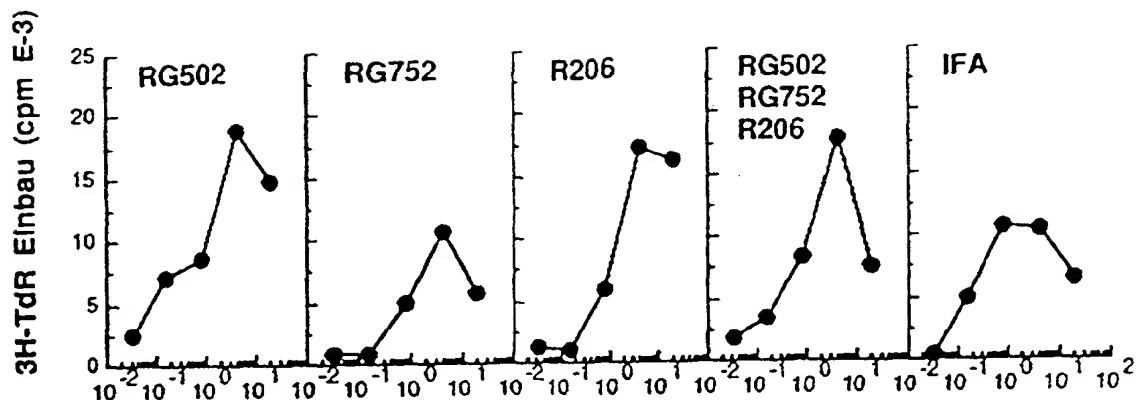


Fig. 6

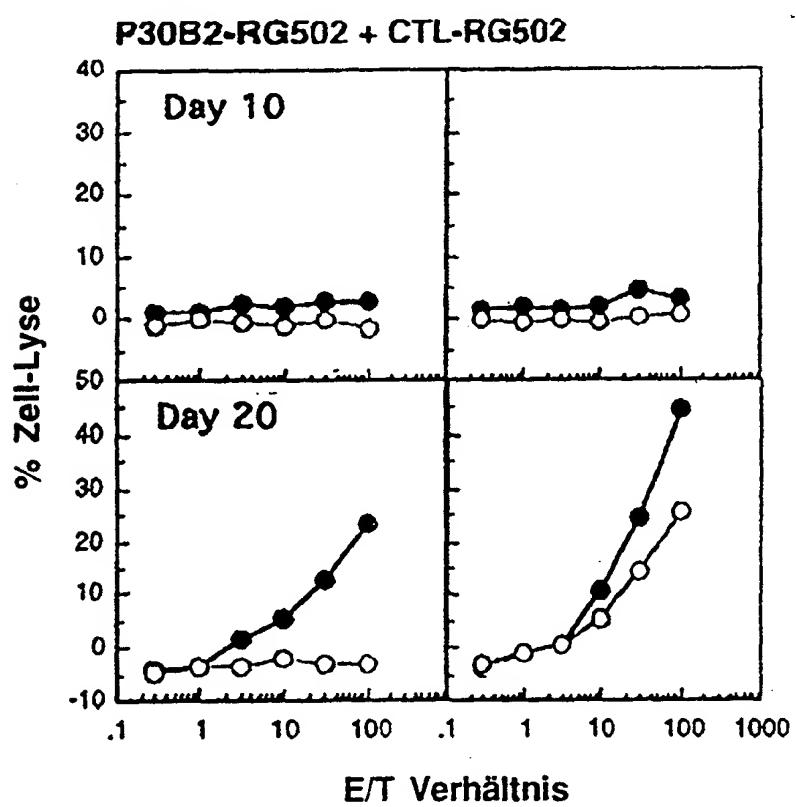


Fig. 7

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K9/16 A61K39/39

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POLYMERS FOR ADVANCED TECHNOLOGIES, vol. 3, no. 6, October 1992 CHICHESTER (GB), pages 351-357, XP 000324943 S. AMSELEM ET AL. 'polymeric biodegradable liposomes (tm) as vaccine delivery systems' see the whole document ---	1-9, 12
Y	WO, A, 91 07171 (NOVA PHARMACEUTICAL CORPORATION) 30 May 1991 see page 26; example 10 see page 39 - page 40; example 28 see page 44 - page 46; examples 36-38 ---	10, 11
Y	---	10

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 24 May 1995	Date of mailing of the international search report 06.06.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Authorized officer Benz, K

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MANUFACTURING CHEMIST, vol. 63,no. 1, January 1992 WOOLWICH (GB), pages 23-26, XP 000301440 K.J. STEFFENS ET AL. 'o/w emulsions as carriers for micronised drug particles' see the whole document ---	11
A	GB,A,2 189 143 (RIBI IMMUNOCHEM RESEARCH INC.) 21 October 1987 see the whole document ---	11
A	VACCINE, vol. 10,no. 10, August 1992 LONDON (GB), pages 714-720, I. ESPARZA ET AL. 'parameters affecting the immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid' see the whole document -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. Application No

PCT/CH 94/00242

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9107171	30-05-91	AU-B-	655162	08-12-94
		AU-A-	6950091	13-06-91
		CA-A-	2068216	14-05-91
		EP-A-	0502119	09-09-92
		US-A-	5188837	23-02-93
		US-A-	5340588	23-08-94
		US-A-	5221535	22-06-93
		US-A-	5227165	13-07-93
<hr/>				
GB-A-2189143	21-10-87	US-A-	4803070	07-02-89
		BE-A-	1001630	27-12-89
		CH-A-	675076	31-08-90
		DE-A-	3712768	22-10-87
		JP-A-	63022029	29-01-88
		NL-A-	8700892	02-11-87
<hr/>				

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K9/16 A61K39/39

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	POLYMERS FOR ADVANCED TECHNOLOGIES, Bd. 3, Nr. 6, Oktober 1992 CHICHESTER (GB), Seiten 351-357, XP 000324943 S. AMSELEM ET AL. 'polymeric biodegradable lipospheres (tm) as vaccine delivery systems' siehe das ganze Dokument	1-9, 12
Y	WO, A, 91 07171 (NOVA PHARMACEUTICAL CORPORATION) 30. Mai 1991 siehe Seite 26; Beispiel 10 siehe Seite 39 - Seite 40; Beispiel 28 siehe Seite 44 - Seite 46; Beispiele 36-38	10, 11
	---	10
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

Siehe Anhang Patentfamilie

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
24. Mai 1995	06. 06. 95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Benz, K

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	MANUFACTURING CHEMIST, Bd. 63, Nr. 1, Januar 1992 WOOLWICH (GB), Seiten 23-26, XP 000301440 K.J. STEFFENS ET AL. 'o/w emulsions as carriers for micronised drug particles' siehe das ganze Dokument ---	11
A	GB,A,2 189 143 (RIBI IMMUNOCHEM RESEARCH INC.) 21.Okttober 1987 siehe das ganze Dokument ---	11
A	VACCINE, Bd. 10, Nr. 10, August 1992 LONDON (GB), Seiten 714-720, I. ESPARZA ET AL. 'parameters affecting the immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid' siehe das ganze Dokument -----	1-12

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
WO-A-9107171	30-05-91	AU-B- AU-A- CA-A- EP-A- US-A- US-A- US-A- US-A-	655162 6950091 2068216 0502119 5188837 5340588 5221535 5227165	08-12-94 13-06-91 14-05-91 09-09-92 23-02-93 23-08-94 22-06-93 13-07-93
GB-A-2189143	21-10-87	US-A- BE-A- CH-A- DE-A- JP-A- NL-A-	4803070 1001630 675076 3712768 63022029 8700892	07-02-89 27-12-89 31-08-90 22-10-87 29-01-88 02-11-87